

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 Brain mechanism regulating puberty onset in female rats
(性成熟を制御する中枢メカニズム)

氏名 MAJARUNE Sutisa

論文内容の要旨

人口増加と経済的発展にともなって、畜産物の需要は世界的に増大しており、家畜の生産性の向上は喫緊の解決すべき課題である。家畜の性成熟とその後の繁殖成績は、生産性に直結するため、適切な飼養管理の元で性成熟を遅延なく導くことが重要である。ヒトにおいても、家畜においても、動物が体成長をおおむね完了するころに性成熟を迎えることは良く知られているが、性成熟を制御する脳内メカニズムはいまだ不明な点が多く残されている。

性成熟に達した哺乳類の雌では、視床下部から性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) がパルス状に分泌される。このパルス状の GnRH 刺激により、下垂体から分泌される性腺刺激ホルモン—卵胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH)—が、卵巣を刺激して、卵母細胞を包む卵胞の発育を促進する。この視床下部—下垂体—性腺軸の活性化による生殖機能の成熟を性成熟という。2003年に性成熟を示さない中枢性性腺機能低下症の患者において発見された *GPR54* 機能喪失性変異に端を発し、今日では *GPR54* の内因性リガンドであるキスペプチンを合成分泌するキスペプチンニューロンが、視床下部からの GnRH 分泌を制御して、性成熟を司るマスターレギュレーターであると考えられる。具体的には、視床下部弓状核に局在するキスペプチンニューロンが GnRH のパルス状分泌を制御するとの説が有力である。一方、前腹側室周囲核に局在するもう一つのキスペプチンニューロンは、十分に発育した卵胞から分泌されるエストロジェンの正のフィードバック作用を仲介し、GnRH のサージ状分泌を制御する排卵中枢であると考えられている。

本学位論文は、性成熟を制御する中枢メカニズムの解明を目的とし、GnRH のパルス状分泌を制御する弓状核キスペプチンニューロンに着目した。弓状核キスペプチンニューロンは、キスペプチンのほかに、ニューロキニン B とダイノルフィン A を合成することから、3種類の神経ペプチドの頭文字をとって、KNDy ニューロンとも呼ば

れている。先行研究から、キスペプチンは GnRH 分泌促進因子として作用し、ニューロキニン B とダイノルフィン A は、KNDy ニューロン自身の神経活動調節因子として作用すると考えられている。これらのことから、性成熟期におけるキスペプチン、ニューロキニン B およびダイノルフィン A の遺伝子 (*Kiss1*、*Tac3* および *Pdyn*) の発現制御メカニズムについて検討した。また、性成熟にともなう卵巣の卵胞発育を組織学的に解析した。

第 3 章では、給餌量を制限することにより、体成長と性成熟を遅延させたラットをモデルとして、自由摂食の再開により惹起される性成熟の過程における *Kiss1*、*Tac3*、*Pdyn* 遺伝子発現を *in situ* hybridization により組織学的に検討した。その結果、制限給餌下においては、弓状核の *Kiss1*、*Pdyn* の遺伝子発現が顕著に抑制されていることを見いだした。一方、自由摂食の再開により、24 時間以内に弓状核における *Kiss1*、*Pdyn* の遺伝子発現が増加し、*Kiss1*、*Tac3*、*Pdyn* の 3 遺伝子の発現が認められるようになると、GnRH パルスの指標となるパルス状の LH 分泌が認められ、卵巣には排卵可能なグラフ卵胞の存在を認めた。また、自由摂食の再開から 48 時間後には、排卵を誘起するサージ状の LH 分泌を認めた。これらの結果から、体成長を遅延させるような負のエネルギーバランスにおいては、KNDy ニューロンにおける *Kiss1*、*Pdyn* の発現が抑制され、GnRH 分泌と卵巣機能の抑制により性成熟が遅延すること、一方、自由摂食の再開による正のエネルギーバランスにおいては、KNDy ニューロンにおける *Kiss1*、*Pdyn* の発現が増加し、GnRH 分泌と卵胞発育の促進を介して、性成熟に至ることを示唆した。

第 4 章では、第 3 章と同様に、体成長と性成熟のタイミングを遅延させたラットをモデルとして、KNDy ニューロンにおける *Kiss1*、*Pdyn* の発現におよぼすエストロジェンの影響について検討した。未熟な卵巣から分泌されるエストロジェンが、性成熟前の動物の GnRH 分泌を抑制することは古くから知られており、性成熟期にはエストロジェン感受性の低下により、GnRH 分泌が生じるというゴナドスタット仮説が提唱されている。著者は、前述の制限給餌モデルラットの卵巣を除去し、一部の動物にはエストロジェンを代償投与することで、血中エストロジェン濃度を実験的に調節したラットを用いて、自由摂食の再開により惹起される性成熟の過程における *Kiss1*、*Tac3*、*Pdyn* 遺伝子発現を検討した。その結果、制限給餌下における *Kiss1* 遺伝子発現抑制は、エストロジェン依存性であることを見いだした。一方、制限給餌下における *Pdyn* 遺伝子発現抑制はエストロジェン非依存性であった。また、自由摂食の再開による正のエネルギーバランスにおいては、エストロジェンの有無によらず、KNDy ニューロンにおける *Kiss1*、*Pdyn* 遺伝子発現の増加を認めた。これらの結果から、KNDy ニューロンにおいて、*Kiss1* 遺伝子発現制御のみがゴナドスタット仮説と一致すること、正のエネルギーバランスを伝達するシグナルによりエストロジェン感受性が変化し、*Kiss1* 遺伝子発現の抑制が解除される可能性が示唆された。

第 5 章では、性成熟を示さない *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの脳内における *Kiss1* 遺伝子発現の再開が卵胞発育の開始に及ぼす影響を検討した。具体的には、

Kiss1 遺伝子欠損ラットの脳内に *Kiss1* 遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを投与した後に、卵巣を採取し、卵胞発育を組織学的に解析した。その結果、*Kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの卵巣にはグラフ卵胞は認められなかったのに対し、弓状核での *Kiss1* 遺伝子発現の再開、KNDy ニューロンの復活とともに、卵胞発育が促進され、排卵可能なグラフ卵胞を認めた。これらの結果から、弓状核 KNDy ニューロンにおけるキスペプチンの合成・分泌が、性成熟にともなう卵胞発育の促進に必須であることが強く示唆された。

第 6 章では、第 3 章から第 5 章で得られた結果から、個体のエネルギーレベルの変化が性成熟を制御するメカニズムについて総合的に考察した。すなわち、体成長が完成に近づき、個体のエネルギーバランスが正に転換するのに伴って、*Pdyn* 遺伝子発現の増加とエストロゲン感受性の低下が生じ、結果として、弓状核 KNDy ニューロンに *Kiss1*、*Tac3*、*Pdyn* 遺伝子発現がすべて揃うことで、GnRH ひいては性腺刺激ホルモンのパルス状分泌が亢進し、卵胞発育が促進されることが明らかとなった。